



⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑩ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 40 733 A 1**

⑩ Int. Cl. 6:
C 07 K 14/435

⑩ Aktenzeichen: 196 40 733.8
⑩ Anmeldetag: 2. 10. 96
⑩ Offenlegungstag: 9. 4. 98

⑩ Anmelder:
Abken, Hinrich, 56414 Meudt, DE

⑩ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑩ Verfahren zur Hemmung der unbegrenzten Profileration, Tumorbildung oder Metastasierung CD30 Antigen exprimierender Zellen

⑩ Die Erfindung betrifft CD30 bindende Moleküle, welche zur Hemmung der unbegrenzten Proliferation, der Tumorbildung oder Metastasierung entarteter Zellen, die das CD30 Antigen auf der Oberfläche ausprägen, geeignet sind. Verfahren zur Gewinnung von solchen Molekülen sowie Verfahren zur Verwendung solcher Moleküle zur Hemmung der unbegrenzten Proliferation, der Tumorbildung oder Metastasierung von CD30 exprimierenden Zellen.

BEST AVAILABLE COPY

DE 196 40 733 A 1

DE 196 40 733 A1

Beschreibung

5 Tierische und menschliche Zellen exprimieren eine Vielzahl von Antigenen auf der Zelloberfläche, wo sie u. a. als Rezeptoren für lösliche Moleküle oder als Kontaktstrukturen zu benachbarten Zellen dienen. Ein geringer
 10 Anteil dieser Oberflächenmoleküle sind bisher in ihrer molekularen Struktur bekannt, deren Funktion ist aber nur für wenige Rezeptoren aufgedeckt.

10 Zahlreiche Oberflächenantigene hämatopoietischer Zellen sind mit Hilfe von Antikörpern im sog. "cluster of differentiation" (CD) definiert. Eines dieser Antigene ist das CD30 Antigen, das nur bei sehr wenigen normalen Zellen ausgeprägt ist, z. B. bei einer Subpopulation von aktivierten CD45RO+ T-Zellen und von normalen Zellen 15 ausgeweitet ist, z. B. in der Umgebung von B-Zell Pollikeln und Germinalzentren im Lymphknoten (Ellis et al., J. Immunol. 151, 2380, 1993). Das CD30 Antigen ist ein phosphoryliertes 120 kDa Membran-Glykoprotein, das aufgrund von Sequenzhomologien der Familie der TNF/NGF Rezeptor Familie zugeordnet wird (Dörkop et al., Cell 68, 421, 1992). Auf der extrazellulären Seite zeigt das CD30 Molekül Homologie zu anderen Mitgliedern dieser Familie, z. B. Typ I und Typ II TNF-Rezeptor, CD27, CD40, 4-1 BB, OX40 und CD95 (Gruss und Dower, Blood 85, 3378, 1995). Der an CD30 bindende Ligand CD30L ist ein Protein, das aufgrund seiner Strukturähnlichkeit der Familie TNF-ähnlichen Proteine zugeordnet wurde. (Smith et al., Cell 73, 1349, 1993). Die Funktion des CD30 Moleküls wie auch seines Liganden ist bisher nicht geklärt.

20 Seit längerem ist bekannt, daß das CD30 Antigen auf der Oberfläche von einigen Tumorzellen in einer sehr viel höheren Dichte ausgeprägt ist als auf der Oberfläche von CD30+ normalen Zellen. So findet man eine erhöhte CD30 Expression in den malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms, den sog. Reed-Sternberg (RS) Zellen, in fast allen pathohistologischen Formen. Auch wird das CD30 Antigen bei Zellen embryonaler und mesenchymaler Tumore sowie bei Epstein-Barr Virus und HTLV I, II-Virus infizierten Lymphozyten und assoziierten Tumoren (EBV+ Burkitt-Lymphom, HTLV-I+ adulte T-Zell Leukämie) gefunden (Pallese und Hamilton-Dutoit, Am. J. Pathol. 133, 446, 2988; Stein et al., Cancer Res. 117, 15, 1989; Pallese, Histopathol. 16, 409, 1990). Die funktionelle Konsequenz der Interaktion von CD30 auf der Oberfläche der Tumorzellen und dem CD30-Ligand auf normalen T-Zellen ist unklar. Bei den Reed-Sternberg Zellen löst der CD30 Ligand nach Bindung an das CD30 Antigen eine verwirrende Vielzahl von verschiedenen Reaktionen der RS-Zellen aus, u. a. eine erhöhte Expression von Oberflächenmolekülen, wie CD54 und B7, oder erhöhte Sekretion von Zytokinen, wie IL-2, Expression von TNF- α , IFN- γ (Gruss und Dower, Blood 85, 3378, 1995). Kreuzverknüpfung der CD30 Antigen-Moleküle auf der TNF- α , IFN- γ (Gruss und Dower, Blood 85, 3378, 1995). Kreuzverknüpfung der CD30 Antigen-Moleküle auf der 25 Hodgkin-Zelle mit Hilfe anti-CD30 Antikörper, z. B. M44 und M67 (Smith et al., Cell 73, 1349, 1993; Gruss et al., Blood 83, 2045, 1994), führt zur Aktivierung der Hodgkin-Zelle, zur gesteigerten Proliferation und Sekretion von IL-6 (Gruss et al., Blood 87, 2443-2449, 1996). IL-6 wiederum unterstützt vermutlich die autonome Proliferation der Hodgkin-Zelle und trägt zum ungehemmten Wachstum des Tumors bei.

30 Das Hodgkin-Lymphom (Lymphogranulomatose) ist mit einem Anteil von ca. 50% aller malignen Lymphome die häufigste Erscheinungsform maligner Prozesse des lymphorektikären Systems. Zwar wird durch eine kombinierte Radio- und Chemotherapie Heilungsquoten von 70% - 85% erreicht, jedoch liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenen Stadien nur etwa bei 50%. Dieses bedeutet, daß immer noch jeder zweite Patient mit einem fortgeschrittenen Hodgkin-Lymphom an den Folgen dieser Erkrankung stirbt, insbesondere aufgrund einer hohen Rate der Therapie-refraktären Rezidive (Dichl, Pfreundschuh, Löffler: Cooperative trials of Hodgkin's lymphoma in the Federal Republic of Germany. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116, 105-108, 1990). Es wird davon ausgegangen, daß die hohe Rate der Rezidive auf persistierende residuale Tumorzellnester im Knochenmark oder anderen infiltrierten Organen zurückzuführen ist, die durch konventionelle Therapeutika und durch Bestrahlung nicht erreicht werden oder eine Resistenz entwickelt haben. Es wird deswegen versucht, mit Hilfe gegen CD30 gerichteter Antikörper gewünschte Pharmaka in der Nähe der Tumorzellen zu akkumulieren, bevorzugt durch Kopplung oder durch Komplexbildung des Antikörpers mit einer pharmazeutisch wirksamen Substanz, z. B. mit zytotoxischen Substanzen (Hellström et al., Antibodies for drug delivery. in: Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications, 2nd ed., Robinson, Lee, Editors, New York, Marcel Dekker, pp 623-632, 1987). Toxine (Vitetta et al., Science 238, 1098-1104, 1987), Radioisotope (Dykes et al., Cancer Treatment Reviews 14, 87-105, 1987) oder Enzymen zur spezifischen Aktivierung von Pro-drugs am Tumor (Sahin et al., Cancer Res. 50, 6944-6948, 1990). Der therapeutische Erfolg in der Unterdrückung der Metastasierung und Rezidive ist jedoch sehr limitiert.

35 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das spezifisch CD30 exprimierende, neoplastisch entartete Tumorzellen in ihrer Fähigkeit zu unbegrenzter Proliferation, zu maligner Tumorbildung und zur Metastasierung hemmt.

40 Diese Aufgabe wird gelöst durch Verwendung eines CD30-bindenden (Poly)Peptids, welches zur Hemmung der unbegrenzten Proliferation, malignen Tumorbildung und Metastasierung geeignet ist und welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das Molekül Spezifität und Affinität zu dem extrazellulären Teil des CD30 Antigens aufweist, keine Kreuzvernetzung der CD30 Antigene auf der Zelloberfläche verursacht und keine intrazelluläre Signalkette des CD30 Antigens auslöst.

45 Es zeigte sich überraschenderweise, daß die erhöhte Expression des CD30 Antigens nach transgener Expression hämatopoietischen, epithelialen oder fibroblastoiden Zellen die Fähigkeit zur malignen Tumorbildung und Metastasierung verleiht, während die Zellen ohne oder mit niedriger Expressionsdichte des CD30 Antigens diese Fähigkeit nicht ausprägen. Überraschenderweise zeigte sich weiterhin, daß Moleküle an den extrazellulären Teil des CD30 Antigens spezifisch binden können, ohne eine Kreuzvernetzung der CD30 Antigene auf der Zelloberfläche zu verursachen und ohne ein intrazelluläres Signal des CD30 Antigens auszulösen. Weiterhin zeigte sich überraschenderweise, daß Moleküle mit diesen Eigenschaften nach Bindung an das CD30 Antigen die Fähigkeit der CD30 exprimierenden Tumorzelle zur unbegrenzten Proliferation, malignen Tumorbildung und Metastasierung unterdrücken.

DE 196 40 733 A1

Bisher war bekannt, daß der CD30-Ligand und anti-CD30 Antikörper u. a. eine Signalübermittlung durch den intrazellulären Teil des CD30 Antigens und schließlich eine Aktivierung der Zelle auslösen (Gruss et al., 1996). Um so überraschender ist es, daß einige wenige Moleküle aus einer unbegrenzten Vielzahl von CD30-bindenden Molekülen dahingehend identifiziert werden konnten, daß sie entgegen der Erwartung nach spezifischer Bindung des CD30 Antigens die Fähigkeit der CD30+ Zelle zur unbegrenzten Proliferation, zur Tumorbildung und zur Metastasierung unterdrücken und keine zelluläre Aktivierung auslösen. Es ist weder aus der Molekülstruktur noch aus der Kenntnis des Epitops auf dem CD30 Antigen vorhersagbar, ob ein CD30 bindendes Molekül eine CD30-vermittelte zelluläre Aktivierung induziert oder nicht.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur die Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30+ Tumorzellen durch in vivo oder in vitro Inokulation mit den erfundungsgemäßen CD30 bindenden Molekülen.

Etablierte CD30+ Tumorzellen, z. B. L540, L428 (Dichl et al, Cancer Treatment Reviews 66, 615–632, 1982), proliferieren *in vitro* ungehemmt und autonom. In Gegenwart der erfundungsgemäßen Moleküle wird jedoch die Proliferation der Zellen supprimiert und schließlich der Zelltod eingeleitet, während bekannte CD30 bindende Moleküle, z. B. die anti-CD30 Antikörper M44 und M67 (Smith et al, Cell 73, 1349, 1993; Gruss et al, Blood 83, 20455, 1994), die Proliferation der Zellen dagegen steigern. Dieser Effekt auf die Zellproliferation ist mit Hilfe dem Fachmann bekannten Verfahren meßbar, z. B. durch Bestimmung der Einbaurate von [$\text{methyl-}^3\text{H}$]Thymidin, Metabolisierung von MTT (Mosman, J. Immunol. Methods 65, 55, 1983), Bestimmung der Anzahl lebender und toter Zellen u. a.

Eine weitere erfindungsgemäße Eigenschaft dieser Molekille ist die Unterdrückung der Tumorgenität und Metastasierung CD30+ Tumorzellen. Zur Messung dieser Eigenschaft steht dem Fachmann u. a. ein Tiermodell zur Verfügung (Kalle et al, *Int. J. Cancer* 52, 887–891, 1992; Kapp et al, *Blood* 82, 1247–1256, 1993). Etablierte CD30+ Hodgkin-Zellen induzieren nach Injektion in immundefiziente Mäuse einen kontinuierlich wachsenden Tumor. Koinokulation der Tumorzellen mit den erfindungsgemäßen CD30 bindenden Molekülen oder spätere Injektion dieser Molekille unterdrückt das Tumorwachstum. Weiterhin gibt das Wachstumsverhalten der Zellen im halbfesten Medium, z. B. im Medium mit Methylcellulose oder Agar in niedrigen Konzentrationen (z. B. 0,3% w/v) (MacPherson und Montagnier, *Virol.* 23, 291–294, 1964), Auskunft über das Potential der Zellen zur Tumorbildung und Metastasierung. Auch bei Anwendung dieses *in vitro* Verfahrens zeigte sich, daß die erfindungsgemäßen Moleküle bei Kointubation mit den CD30+ Tumorzellen das Potential zur Tumorbildung und verankerungsunabhängigem Wachstum unterdrücken.

Auch können die erindungsgemäßen Moleküle auf Oberflächen, z. B. Polystyrol, aufgebracht werden, um CD30+ Zellen in einer Zellpopulation, z. B. Blut oder Knochenmark, zunächst auf der Oberfläche zu binden und anzureichern, um sie sodann aus der Zellpopulation zu entfernen und zugleich in ihren Tumoreigenschaften zu supprimieren. Diese Ausführungsform ermöglicht z. B. ein gezieltes Purging von autologem Knochenmark bei metastasierten CD30+ Tumoren.

Das CD30 Antigen-bindende Molekül mit den erfundungsgemäßen Eigenschaften wird bevorzugt nach folgendem Verfahren generiert. Ein nicht-zellaktivierend wirkender anti-CD30 Antikörper, der typischerweise zwei Bindungsvalenzen aufweist und damit kreuzvernetzend für das CD30 Antigen wirkt, wird nach dem Fachmann bekannten Verfahren zu einem monovalenten CD30-bindenden Molekül umgewandelt. Dieses kann durch Modifikation des Immunglobulins oder durch Neurekombination der kodierenden cDNAs für die variablen Regionen (V-Regionen der leichten (VL) und schweren (VH) Kette) des Antikörpers und anschließender heterologer Expression des rekombinierten Moleküls geschehen. Bevorzugt ist folgendes Vorgehen: Die cDNAs für die VL und für die VH Regionen wird aus der mRNA von Hybridomzellen, die ein anti-CD30 Immunglobulin produzieren, nach dem Fachmann bekannten Verfahren (Sambrook et al, Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 8.11 - 8.13, 1989) gewonnen, bevorzugt durch Hybridisierung mit geeigneten Konsensus-DNS-Proben oder durch PCR mit Hilfe von VL bzw. VH spezifischen Oligonukleotid-Primer Molekülen. Die cDNA-Moleküle für die VL bzw. VH Region werden kovalent unter Wahrung des Leserasters für die Proteintranslation verknüpft, wobei eine cDNA-Sequenz für ein Brückenpeptid zwischen die VL und VH cDNA-Sequenzen ligiert wird. Bevorzugt wird das Oligo-Peptid (Gly4Ser)3 als Brückenpeptid. Dem Fachmann stehen jedoch auch andere Brückenpeptide zur Verfügung. Die Anordnung für das Fusionspeptid mit den gesuchten Eigenschaften kann sowohl VL-Brückenpeptid-VH als auch VH-Brückenpeptid-VL sein. Die rekombinierte cDNA-Sequenz wird in einen Expressionsvektor unter der Kontrolle eines geeigneten Promoter/Enhancers nach dem Fachmann bekannten Verfahren inseriert und nach Gentransfer in einem geeigneten prokaryonten oder eukaryonten Wirtsorganismus exprimiert. Das so gewonnene rekombinante Molekül hat nur eine Bindungsvalenz für das CD30 Antigen.

Weiterhin steht dem Fachmann ein Verfahren zur Verfügung, aus einer Bibliothek zufällig angeordneter Aminosäuresequenzen, bevorzugt Hexapeptide, mit Hilfe der "Phage display Technik" die Moleküle zu isolieren, die an den gewünschten Teil des CD30 Antigens binden. Auch diese Peptide weisen typischerweise eine monovalente Bindungsstelle auf und sind für die erfahrungsgemäße Verwendung geeignet.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist daher eine erfahrungsgemäße Polypeptid-Sequenz, welche die in SEQ ID NO 1 gezeigte Aminosäuresequenz enthält:

Das erfundungsgemäße Polypeptid zeigt weiterhin Eigenschaften, die für eine breite therapeutische und diagnostische Anwendung gewünscht sind. Dieses sind u. a. hohe Spezifität und Affinität für das CD30 Antigen und damit eine außerordentliche Selektivität für die Zielzellen, ein geringes Molekulargewicht, gute Gewebepermeation und vorteilhafte Pharmakokinetik (gute renale Clearance, geringer Verweildauer im peripheren Blut). Das erfundungsgemäße CD30-bindende Protein weist außerdem eine außerordentlich geringe Immunogenität im Menschen auf. Die für die Auflösung der humanen-anti-Maus-Antikörper-(HAMA)-Reaktion verantwortlichen Domänen muriner Immunglobuline sind in dem CD30-bindenden (Poly)Peptid nicht vorhanden.

DE 196 40 733 A1

Ein weiterer Vorteil der Oligo- oder Polypeptide zur erfundungsgemäßen Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30+ Zellen ist, daß die Peptide mit Hilfe der cDNS-Sequenz und einem geeigneten Expressionsvektor in Bakterien oder Hefe oder anderen prokaryonten oder eukaryonten Wirtszellen nach dem Fachmann bekannten Verfahren in jeder gewünschten Menge bei gleichbleibender Qualität produziert werden. Dabei können die notwendigen Qualitätsstandards für therapeutische Anwendungen (Begent et al, Europ. J. Cancer 29A; 1907 – 910, 1993) sehr leicht eingehalten werden.

5 Weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist die kovalente oder nicht-kovalente Kopplung des CD30-bindenden Peptids an andere gewünschte Moleküle zur Verstärkung oder zum Monitoring der erfundungsgemäßen Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30+ Tumorzellen. Dem Fachmann stehen für diese Kopplung eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung. Folgende bevorzugte Modifikationen und ihre Verwendungen sollen hier nur beispielhaft genannt werden.

10 Eine bevorzugte Anwendung des erfundungsgemäßen Proteins liegt in dem immunscintigraphischen Aufspüren von mit CD30+ Tumorzellen befallenden Organen, insbesondere Metastasen, in vivo und zum Monitoring der Tumurregression. Dabei ist es von besonderer Bedeutung, daß die Bindung des CD30-Detektionsmoleküls 15 keine Aktivierung und Proliferation-Steigerung der CD30+ Zellen induziert. In einer bevorzugten Anwendung wird in das erfundungsgemäße CD30-bindende Protein eine Cys-haltige Peptidkette eingeführt und das rekombinante Protein nach dem Fachmann bekanntem Verfahren mit ^{99m}Tc an der freien Thiolgruppe des Cysteins direkt markiert (Dean et al, Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine, Raven Press, New York, pp 605 – 608, 1990; Liberatore et al, Europ. J. Nucl. Med. 22: 1326 – 1329, 1995). Die Einführung der 20 Cys-haltigen Seitenkette geschieht z. B. durch Klonierung der cDNS in die SfiI/NotI Stelle von pDN23 (Hoogenboom et al, Nucleic Acids Res. 19, 4133 – 4137, 1991), wodurch die cDNS für das C-terminale Ende des CD30-bindenden Proteins mit der cDNS für das Heptapeptid GGSSGSG und der myc-tag Sequenz fusioniert wird. Das ^{99m}Tc -markierte CD30-bindende Protein reichert sich nach intravenöser oder intralymphatischer Injektion am Ort des Tumors an und kann mit scintigraphischen Verfahren lokalisiert werden.

25 Weiterhin kann das erfundungsgemäße Verfahren zur Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung CD30+ Tumorzellen in seiner Effizienz dadurch verstärkt werden, daß das erfundungsgemäße CD30-bindende Peptid gekoppelt mit ^{32}P oder anderen länger-lebigen Isotopen verwendet wird. Die radioaktive Markierung geschieht z. B. nach dem Fachmann bekannten Verfahren durch Fusion der 30 cDNS-Sequenz für das Oligopeptid DDDSDDD an die cDNS für das CD30-bindenden Peptid, Expression des Fusionsproteins und Kinasierung des Serins im gekoppelten DDDSDDD-Oligopeptid mit Hilfe der Casein-Kinase und [γ - ^{32}P]ATP (Marin et al, Europ. J. Biochem. 160, 239 – 244, 1986; Britton et al, Nucl. Med. Commun., 12, 339 – 347, 1991).

35 Zur Erleichterung der Reinigung des erfundungsgemäßen CD30-bindenden Polypeptids ist dessen Kopplung mit Calmodulin (CAL) zum Vorteil. Außerdem ermöglicht diese Modifikation eine Kopplung des CD30-bindenden Proteins mit Peptid- oder Nicht-Peptid-CAL-Bindemolekülen und damit ein spezifisches Akkumulieren dieser Moleküle auf der Oberfläche CD30+ Zellen. Dieses kann zur Verstärkung der erfundungsgemäßen Anwendung des CD30-bindenden Proteins genutzt werden. Bevorzugt sind in dieser Anwendungsförme Alanin-substituierte CAL-Bindopeptide, die eine erhöhte Affinität gegenüber dem nicht-modifizierten CAL Peptid zeigen (Montigiani et al, J. Mol. Biol. 258, 6 – 13, 1996). Beispielhaft sei genannt die Beladung mit CAL-bindenden, radioaktiv markierten Molekülen beladen zum Einsatz in der Mehrschritt-Immunscintigraphie nach dem Fachmann bekannten Verfahren (VanEldik und Lukas, Methods Enzymol. 139, 393 – 4055, 1987; Török und Trentham, Biochemistry 33, 12807 – 12820, 1994). Das erfundungsgemäße CD30-bindende Einzelketten-Protein ermöglicht einen überraschend sensitiven und extrem spezifischen immunscintigraphischen Nachweis von CD30+ Tumorzellen in vivo (z. B. Fernmetastasen oder Knochenmarkinfiltrationen), ohne die detektierten Tumorzellen zu aktivieren oder gar in ihrer Proliferationskapazität zu steigern. Bei dem derzeitigen Stand der Technik sind jedoch nur anti-CD30 Antikörper verfügbar, die bei schlechter Gewebehypertension eine Kreuzsteigerung des CD30 Antigens und eine Aktivierung der CD30-Tumorzellen induzieren, was eine ungewöhnliche Steigerung der Tumorgenität zur Folge hat.

40 Eine weitere bevorzugte Anwendungsform zur Effektivitätssteigerung der erfundungsgemäßen Verwendung des Moleküls liegt in der Herstellung von modifizierten Molekülen mit "Designer" Effektor-Funktionen. Z.B. können nach bekannten Verfahren (Übersicht bei Neri et al, Engineering recombinant antibodies for immunotherapy. Cell. Biophys. 27: 47 – 61, 1995) verschiedene chimäre, stöchiometrisch definierte Fusions-Moleküle, bevorzugt Fusionsproteine, bestehend aus dem erfundungsgemäßen CD30-bindenden Einzelketten-Protein und anderen Polypeptiden durch Fusion der entsprechenden cDNS-Sequenzen hergestellt werden. Bevorzugt sind z. B. Konjugationen an andere Polypeptide, Zuckermoleküle, Lipide oder andere synthetische oder natürliche Substanzen, Radionukleotid-Chelatoren, Biotin oder auch die Kopplung mit pharmakologisch wirksamen Substanzen, z. B. Molekülen mit zytotoxischer Aktivität (z. B. RicinA, Perforin) oder prodrug Substanzen, Proteine mit Signalfunktionen (z. B. Zytokine) oder Proteinen mit enzymatischer Aktivität (z. B. Metalloproteinase, Endopeptidasen) oder anderen Peptiden. Auch ist eine Kopplung mit Nukleinsäuren, z. B. Ribonukleinsäuren mit Ribozymaktivitäten, möglich, z. B. mit Hilfe einer Biotin-Streptavidin(Avidin)-Biotin Brücke zwischen Biotin markiertem Peptid und Biotin markierter Nukleinsäure. Bei der erfundungsgemäßen Verwendung zur Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30+ Zellen wird durch dieses Trägermolekül eine bevorzugte Anreicherung des Fusionsbestandteils an dem Ort hoher CD30 Antigen-Dichte erreicht.

45 50 Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Effektivität des erfundungsgemäßen Verfahrens besteht in der Kopplung mit einem weiteren bindungsfähigen Molekül, das seinen Liganden auf einer immunkompetenten Zelle hat, z. B. auf T-Zellen oder NK-Zellen. Dadurch erzielt das bispezifische anti-CD30-anti-T-Zell/LNK-Zell-Molekül neben der erfundungsgemäßen Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder

DE 196 40 733 A1

Metastasierung CD30+ Tumorzellen zugleich eine Steigerung zellulärer Immunabwehr am Ort des Tumors.

In einer besonderen Ausführungsform kann das erfindungsgemäße CD30-bindende Protein mit einer intrazellulären Signalkette fusioniert und in geeigneten Wirtszellen exprimiert werden. Überraschend zeigte sich dabei, daß ein durch Bindung des CD30 Antigens getriggertes biochemisches Signal auf der fusionierten heterologen Signalpeptidkette ausgelöst wird. Beispielhaft wird folgende Konstruktion beschrieben, dem Fachmann stehen jedoch weitere Kombinationen offen: z. B. Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 720-724, 1993; WO 93/9163. Das erfindungsgemäße CD30-bindende Protein wird mit der Signal transduzierenden γ -Kette des menschlichen "high affinity" IgE Fc Rezeptors fusioniert, die in immunkompetenten Zellen Teil des T-Zell-Rezeptors (Paolini et al., J. Exp. Med. 181, 247, 1995; Orloff et al., Nature 347, 189, 1990) und verschiedener IgG Fc Rezeptoren (Schöneich et al., J. Immunol. 148, 2181, 1992) ist. Dem Fachmann stehen weitere Signalketten zur Fusion zur Verfügung, z. B. die ζ -Kette des CD3 T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Das Fusionsprotein wird in immunkompetenten Zellen zur Expression gebracht. Ohne CD30 Antigen-Bindung übermittelt die fusionierte γ -Kette kein zelluläres Aktivierungssignal, jedoch nach Kontakt mit CD30+ Tumorzellen überraschendweise eine spezifische Signalkaskade der Fc γ -Kette, die durch Bindung an das CD30 Antigen ausgelöst wird und zu einer zellulären Aktivierung der Wirtszelle führt. Bei cytotoxischen T-Zellen als Wirtzelle für das Fusionsmolekül zeigt sich dieses dem Fachmann in einer Erhöhung der IL-2 Sekretion und in der Ausprägung einer spezifischen Zytotoxizität gegen CD30+ Tumorzellen. Das Signal kann in Abhängigkeit von der nachgeschalteten Signalkette im Fusionsprotein und in Abhängigkeit von der Wirtszelle zur Zellaktivierung, zur Auslösung spezifischer zellulärer Funktionen (Zytotoxizität, Sekretion von Zellprodukten), zur Proliferation oder zum programmierten Zelltod führen.

Der Einsatz des erfundungsgemäßen CD30-bindenden Proteins wird in folgenden Beispielen näher erläutert.

5

10

15

20

25

30

33

4

4

1

4

1

1

DE 196 40 733 A1

SEQ ID NO 1.

5 **Polypeptid-Sequenz des CD30-bindenden Einzelketten-Proteins.**

10 Dargestellt ist die Aminosäure-Sequenz (frame: one-letter-code) des CD30-bindenden Peptids. Darunter ist die cDNS-Sequenz (5'- 3') 15 aufgeführt, wie sie bevorzugt zur Expression der Aminosäure-Sequenz verwendet wird. Die beanspruchte Aminosäure-Sequenz ist 20 unterstrichen. Das integrierte Peptid (cDNS bp 352-443) ist ein Beispiel für ein Brückenpeptid. Dem Fachmann stehen weitere geeignete 25 Brückenpeptide zur Verfügung.

25

(i) Sequenzkennzeichen:

30 (A) Art: 1. Peptid Länge: 248 Aminosäuren
2. Nucleotid Länge: 744 Basenpaare

35

(B) Strangform: 1. Einzelstrang
2. Doppelstrang

40

(C) Topologie: 1. linear
2. linear

45

(ii) Art des Moleküls: 1. rekombinantes Polypeptid
50 2. rekombinante cDNS

55

60

65

DE 196 40 733 A1

frame : M A Q V O L Q Q S G A E L A R P G A S V
 5' ATGGCCACAGTGC~~A~~CTGGCAGCAGT~~C~~AGGCGCTGAGCT~~G~~GTAGCC~~C~~GGCT~~T~~AGTG 3'
 10 20 30 40 50 60
 3' TACCGG~~T~~OCAC~~G~~GTGAG~~G~~TGCTGAG~~T~~CTGAC~~G~~CTGAC~~G~~ATC~~G~~GA~~C~~GGAGTCAC 5'
 5

frame : K M S C K A S G Y T F T T Y T I H W V R
 5' AAGATG~~T~~CTGCAAGGCTTCTGCTACACCTTACTACCC~~A~~ACACAA~~T~~ACACTGGTAA~~G~~A 3'
 70 80 90 100 110 120
 3' TCTACAGGAGG~~T~~CTGGAA~~G~~ACCC~~A~~ATG~~G~~GA~~A~~ATGAT~~G~~CA~~G~~GTG~~T~~ATG~~G~~ACOCATCT 5'
 10

frame : O R P G H D L E W I G Y I N P S S G Y S
 5' CAGAGG~~T~~CTGGACACGATCTGGAATGGATTC~~C~~ATAC~~T~~TAATCCTAGCAGTGGTATTC 3'
 130 140 150 160 170 180
 3' G~~T~~ATGGAC~~C~~TG~~G~~CTAG~~C~~CTTA~~C~~TA~~C~~TA~~G~~TAA~~T~~AGGATG~~T~~ACCC~~T~~ATAAGA 5'
 15 20

frame : D Y N O N F K G K T T L T A D K S S N T
 5' GACTACAA~~T~~CTGAAC~~T~~CAAGGCAACAC~~T~~AC~~T~~TC~~G~~ACACAA~~G~~T~~T~~CT~~C~~AA~~C~~ACA 3'
 190 200 210 220 230 240
 3' CTGATG~~T~~TA~~G~~TCTGAAG~~T~~CCGGT~~C~~TGG~~G~~TA~~A~~CTG~~G~~T~~G~~T~~C~~AGGAGG~~T~~GGT 5'
 25

frame : A Y M O L N S L T S E D S A V Y Y C A R
 5' G~~C~~TACATG~~C~~AA~~T~~CAAC~~T~~CA~~G~~CTGACATCTGAGGACTCTGGGCTTATTAC~~G~~GA~~A~~ 3'
 250 260 270 280 290 300
 3' CGCATG~~T~~AC~~G~~TC~~A~~CTG~~T~~GGACTG~~T~~GA~~T~~CT~~C~~TGAGA~~G~~CCAGATA~~A~~TCACAGCTCT 5'
 30

frame : R A D Y G N Y E Y T W F A Y W G Q G T T
 5' AGAGGG~~T~~ACTATG~~T~~TA~~A~~CT~~T~~AA~~T~~ATAC~~T~~GGTT~~T~~GGCT~~T~~ACTGGCC~~C~~AGGG~~T~~ACT~~G~~ 3'
 310 320 330 340 350 360
 3' TCTG~~G~~CTG~~T~~ATACC~~A~~TTG~~T~~ATG~~T~~ATATG~~A~~CCAAACG~~A~~ATGACCCGG~~T~~CTGG~~G~~C 5'
 40

frame : V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S
 5' G~~T~~CA~~C~~CTC~~T~~CC~~T~~AGG~~T~~GG~~G~~GG~~T~~CA~~G~~GGGGAGG~~T~~GGC~~T~~CTGGGG~~T~~GGGGAT~~G~~ 3'
 370 380 390 400 410 420
 3' CAC~~T~~CC~~C~~AC~~G~~GG~~T~~CC~~A~~CT~~T~~GG~~C~~AA~~G~~T~~G~~GG~~C~~CT~~C~~AC~~G~~AA~~G~~GG~~T~~GG~~C~~CT~~A~~G~~C~~ 5'
 45

frame : D I E L T Q S P K F M S T S V G D R V N
 5' GACATG~~C~~AC~~T~~CA~~T~~CA~~G~~TCTCCAAATTC~~A~~CTG~~T~~CCACATCAGT~~G~~AGAGACAGGG~~T~~CAAC 3'
 430 440 450 460 470 480
 3' C~~T~~GTAG~~T~~CGAG~~T~~GA~~T~~CTG~~T~~CA~~G~~GGTTTAAG~~T~~ACAGG~~T~~GT~~G~~AC~~T~~CTC~~T~~GT~~T~~CCCAGT~~G~~ 5'
 50

55

60

65

DE 196 40 733 A1

frame :: V T Y K A S O N V G T N V A W F Q Q K P
 5' GTCACTTACAAGGOCAGTCAGAATGIGGGTACATGATGAGCTGGTTCAACAAAAACCA 3'
 490 500 510 520 530 540
 3' CAGIGGATGTTCGGTCACTACACCCATGATTACATUGGACCAAAGTTGTTTGGT 5'
 5

frame :: G Q S P K V L I Y S A S Y R Y S G V P D
 5' GGCCAAATCTCCTAAAGTCIGATTACTCCCATCTTACGATACAGIGGGGCGGCGAT 3'
 10 550 560 570 580 590 600
 3' CCCGTTAGAGGATTCAAGACTAAATGAGGCTAGAAATGGCTATGTCACCTCAGGGACTA 5'
 15

frame :: R F T G S G S G T D F T L T I S N V O S
 5' CGCTTCACAGCCAGCTGGATCTGGAAACAGATTCTACCTCTCACATCAGGAATGIGGAGCT 3'
 15 610 620 630 640 650 660
 3' GGAAAGTGTGGTCACCTAACGCTTGTCTAAAGTGAGAGTGTTGAGTGTACAGTCAGA 5'
 20

frame :: E D L A E Y F C O O Y H T Y P L T F G G
 5' GAAGACTTGGCAGAGTATTCTGTCAAGCTATACACCTTATCTCACGTTGGAGGG 3'
 25 670 680 690 700 710 720
 3' CTTCCTGAAACGCTCTATAAGACAGTCGTTATAGTGIGGGATAGGAGAGTGCAAGCTCCC 5'
 25

frame :: G T K L E I K R
 30 5' GGCAACCAAGCTGGAAATCAAACGG 3'
 730 740
 3' CGTGGGTGACCTTGTAGTGTGCG 5'
 35

Patentansprüche

1. Verfahren zur Unterdrückung der unbegrenzten Proliferation, Tumorbildung oder Metastasierung von CD30 Antigen exprimierenden Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Molekül verwendet wird, das spezifisch an das CD30 Antigen bindet, ohne eine zelluläre Aktivierung durch das CD30 Antigen auszulösen.
- 40 2. Verfahren zur Gewinnung eines Moleküls nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper oder rekombinantes Poly- oder Oligopeptid durch Bindung an das CD30 Antigen isoliert wird, eine monovalente Antigen-Bindungsstelle erzeugt wird und auf die Eigenschaft selektiert wird, keine intrazelluläre Signalübermittlung durch das CD30 Antigen nach CD30-Bindung auszulösen.
- 45 3. Molekül zur Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekül aus der in SEQ ID NO 1 spezifizierten Polypeptidsequenz oder aus bindungsfähigen Oligopeptidsequenzen dieser Sequenz besteht.
- 50 4. Molekül nach den Ansprüchen 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß einzelne Bausteine des Moleküls deletiert, hinzugefügt oder durch andere ersetzt werden, kovalent oder nicht-kovalent modifiziert oder mit anderen Molekülen gekoppelt werden.
- 55 5. Verwendung des Moleküls nach den Ansprüchen 2—4, dadurch gekennzeichnet, daß CD30 exprimierende Zellen *in vivo* oder in Körperflüssigkeiten, Zellsuspensionen oder Geweben *in vitro* spezifisch aufspürt, gebunden oder angereichert werden.
- 60 6. Verwendung des Moleküls nach den Ansprüchen 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß eine an das Molekül gekoppelte Substanz *in vivo* oder *in vitro* in der Nähe von CD30 exprimierenden Zellen akkumuliert.
- 65 7. Verwendung des Moleküls nach den Ansprüchen 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekül an ein geeignetes Molekül gekoppelt und eine chemische oder physikalische Reaktion dieses Moleküls nach Bindung des CD30 Antigens ausgelöst wird.

60

65

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.